



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년10월18일
(11) 등록번호 10-1787701
(24) 등록일자 2017년10월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/41 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A23L 33/105 (2016.01) A61K 31/192 (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01) A61K 31/7048 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 36/41 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2017-0078803(분할)
(22) 출원일자 2017년06월21일
심사청구일자 2017년06월21일
- (62) 원출원 특허 10-2016-0082238
원출원일자 2016년06월30일
심사청구일자 2016년06월30일
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020140072464 A
JP2015212290 A
경희대학교 대학원 석사학위논문, 와송의 성분연구 및 μ -calpain 억제 활성 (2007.).
- (73) 특허권자
한남대학교 산학협력단
대전광역시 유성구 유성대로 1646 (전민동)
충남대학교 산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
- (72) 발명자
장해동
대전광역시 유성구 엑스포로 448 엑스포아파트 105동 301호
김영호
대전광역시 유성구 봉명로 48, 801-302(인스빌리베라)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
박노춘

전체 청구항 수 : 총 2 항

심사관 : 고일영

(54) 발명의 명칭 와송 추출물을 유효성분으로 포함하는 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물

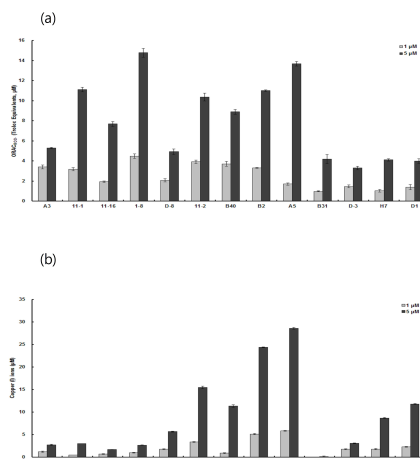
(57) 요약

본 발명은 와송 추출물; 그의 분획물; 화학식 1 내지 13의 화합물 중 하나 이상의 화합물; 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 유효성분으로 포함하는 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

본 발명은 쉽고 간단하게 제조할 수 있으며 약효가 우수한 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공할 수 있다.

또한 본 발명은 장기간 복용 시 체중 증가, 두통 등의 부작용을 최소화할 수 있는 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)
A61K 31/192 (2013.01)
A61K 31/352 (2013.01)
A61K 31/7048 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/306 (2013.01)

권용범

대전광역시 유성구 엑스포로 448 엑스포아파트 10
 7동 703호

(72) 발명자

이상현

대전광역시 중구 학교개로34번길 16-6

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345261167

부처명 교육부

연구관리전문기관 한남대학교 산업단지캠퍼스

연구사업명 교육-R&D-고용 선순환 창조생태계조성 사업

연구과제명 산학융합연구실 (건강기능식품 효능검증 산학융합연구실)

기 여 율 1/1

주관기관 한남대학교

연구기간 2015.07.01 ~ 2016.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

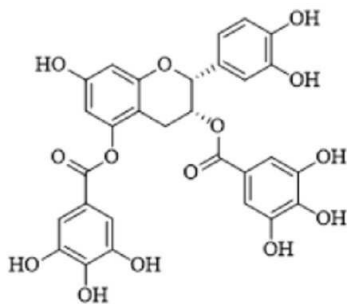
삭제

청구항 2

화학식 9의 화합물을 유효성분으로 포함하는 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물에 있어서,

상기 조성물은 높은 peroxy radical 소거 활성 및 reducing capacity를 나타내고, 세포 내 산화 스트레스를 감소시켜 우수한 세포 내 항산화 활성을 나타내며, 높은 파골세포 분화 억제 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[화학식 9]

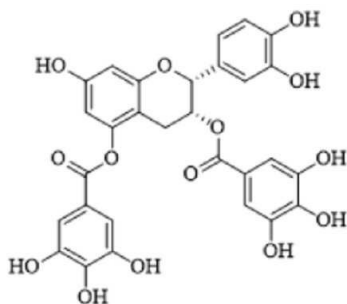


청구항 3

화학식 9의 화합물을 유효성분으로 포함하는 골다공증 예방 또는 개선용 식품 조성물에 있어서,

상기 조성물은 높은 peroxy radical 소거 활성 및 reducing capacity를 나타내고, 세포 내 산화 스트레스를 감소시켜 우수한 세포 내 항산화 활성을 나타내며, 높은 파골세포 분화 억제 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[화학식 9]



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 와송 추출물; 그의 분획물; 화학식 1 내지 13의 화합물 중 하나 이상의 화합물; 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 유효성분으로 포함하는 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 식물 유래의 다양한 화학물질들은 항 골다공증 작용, 파골세포 분화 억제 작용과 세포보호 작용을 포함한 여러 가지 생리활성들을 나타내어 건강기능식품의 유용한 소재로서 각광을 받고 있다.

[0004] 와송(*Orostachys japonicus*)은 일명 바위솔로 불리는 쌍떡잎식물 장미목 돌나물과의 다년생 초본식물로, 한방고서에 항암효과, 해열, 지열, 간염, 습진, 화상 등에 특효가 있다고 기록되어 있다.

[0005] 최근에 와송의 다양한 생리활성에 대한 연구결과들이 다수 보고되고 있으며, 이와 관련하여 한국등록특허 제10-0966719호는 와송 메탄올 추출물을 클로로포름으로 용매분획한 후 에틸아세테이트로 더 용매 분획하여 얻은 와송 에틸아세테이트 분획물인 와송 추출물을 포함하는 비만 억제용 조성물을 개시하고 있다.

[0006] 또한 한국등록특허 제10-1133604호는 와송 추출물과 감초 추출물을 복합 유효성분으로 포함하고, 조성물의 총중량에 대하여 상기 와송 추출물의 함량은 0.1 내지 20중량%이고, 상기 감초 추출물의 함량은 0.1 내지 10중량%인 것을 특징으로 하는 와송을 이용한 아토피성 피부염 증상 개선용 화장료 조성물을 개시하고 있다.

[0007] 한편 한국공개특허 제10-2013-0072660호는 와송 유래 에틸아세테이트 분획물을 유효성분으로 포함하고, 와송 유래 에틸아세테이트 분획물은 20 내지 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 조성물에 포함되는 것을 특징으로 암의 예방 또는 치료용 조성물을 개시하고 있다.

[0008] 그러나 상기 문헌에 개시된 기술은 비만 억제용 조성물, 아토피성 피부염 증상 개선용 화장료 조성물 또는 암의 예방용 조성물에 관한 것으로서, 제조방법이 복잡하고 약효가 우수하지 않으며, 와송 추출물의 골다공증 예방 또는 치료 효과에 대해서는 전혀 개시하고 있지 않다.

[0009]

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-0966719호
(특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-1133604호
(특허문헌 0003) 한국공개특허 제10-2013-0072660호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 상기 종래 기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로서, 쉽고 간단하게 제조할 수 있으며 약효가 우수한 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 또한 본 발명은 장기간 복용 시 체중 증가, 두통 등의 부작용을 최소화할 수 있는 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

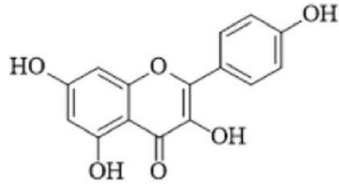
과제의 해결 수단

[0014] 상기과 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 (a) 와송을 메탄올로 가열 추출하고 감압 농축하여 추출물을 수득하는 단계; (b) 상기 추출물을 물에 현탁 시킨 후 노르말헥산, 클로로포름 및 에틸아세테이트 순으

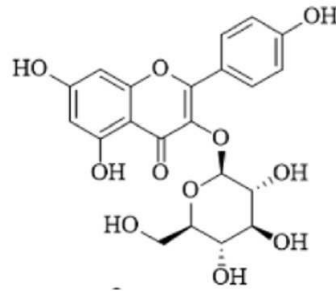
로 분획하여 노르말렉산 분획물, 클로로포름 분획물 및 에틸아세테이트 분획물을 수득하는 단계; 및 (c) 상기 에틸아세테이트 분획물을 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 화학식 1 내지 13의 화합물을 분리하는 단계를 포함하는 와송으로부터 골다공증 예방 또는 치료용 화합물을 분리하는 방법을 제공한다.

[0016]

[화학식 1]



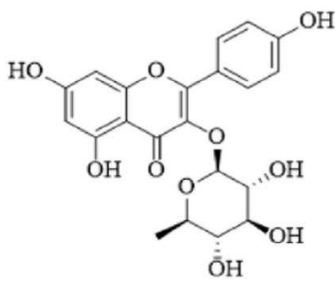
[화학식 2]



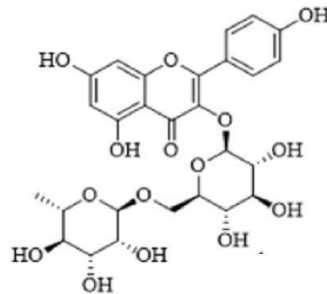
[0017]

[0019]

[화학식 3]



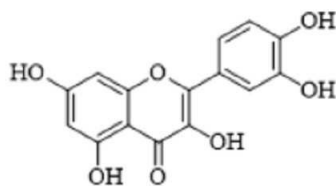
[화학식 4]



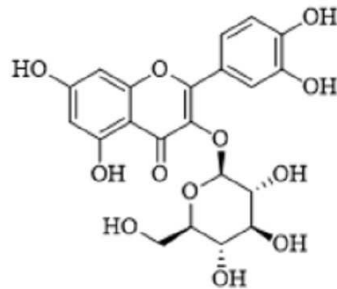
[0020]

[0022]

[화학식 5]



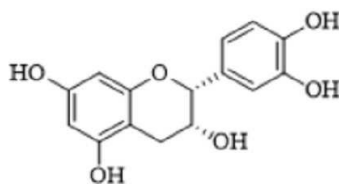
[화학식 6]



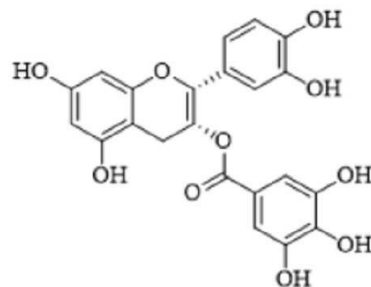
[0023]

[0024]

[화학식 7]



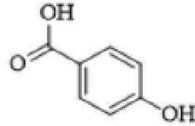
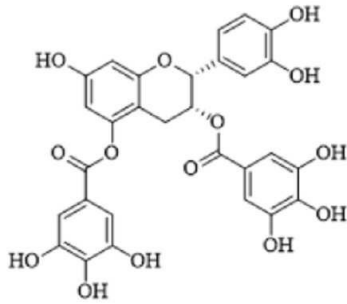
[화학식 8]



[0025]

[0027] [화학식 9]

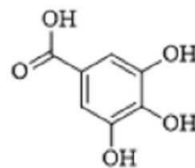
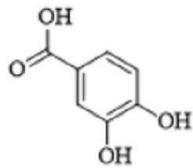
[화학식 10]



[0028]

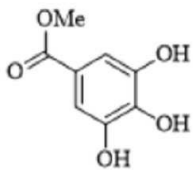
[0030] [화학식 11]

[화학식 12]



[0031]

[0033] [화학식 13]



[0034]

[0036] 또한 본 발명은 와송 추출물; 그의 분획물; 화학식 1 내지 13의 화합물 중 하나 이상의 화합물; 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 유효성분으로 포함하는 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0037] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 와송 추출물은 와송을 메탄올로 가열 추출하고 감압 농축하여 수득하는 것을 특징으로 한다.

[0038] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 분획물은 상기 와송 추출물을 물에 현탁 시킨 후 노르말헥산, 클로로포름 및 에틸아세테이트 순으로 분획하여 수득되는 에틸아세테이트 분획물인 것을 특징으로 한다.

[0039] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 화학식 1 내지 13의 화합물은 상기 에틸아세테이트 분획물을 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 수득되는 것을 특징으로 한다.

[0040] 아울러 본 발명은 와송 추출물; 그의 분획물; 화학식 1 내지 13의 화합물 중 하나 이상의 화합물; 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 유효성분으로 포함하는 골다공증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0041] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 와송 추출물은 와송을 메탄올로 가열 추출하고 감압 농축하여 수득하고, 상기 분획물은 상기 와송 추출물을 물에 현탁 시킨 후 노르말헥산, 클로로포름 및 에틸아세테이트 순으로 분획하여 수득되는 에틸아세테이트 분획물이며, 상기 화학식 1 내지 13의 화합물은 상기 에틸아세테이트 분획물을 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 수득되는 것을 특징으로 한다.

[0042] 또한 본 발명은 와송을 메탄올로 가열 추출하고 감압 농축하여 제조되는 골다공증 예방 또는 개선용 와송 추출물에 있어서, 상기 와송 추출물은 화학식 1 내지 13의 화합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 또는 개선용 와송 추출물을 제공한다.

발명의 효과

[0044] 본 발명은 쉽고 간단하게 제조할 수 있으며 약효가 우수한 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공할 수 있다.

[0045] 또한 본 발명은 장기간 복용 시 체중 증가, 두통 등의 부작용을 최소화할 수 있는 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0047] 도 1은 와송 추출물의 에틸아세테이트 분획물에서 분리한 화합물의 peroxy radical 소거 활성 및 reducing capacity를 나타낸다. (a) peroxy radical scavenging activity, (b) reducing capacity

도 2는 와송 추출물의 에틸아세테이트 분획물에서 분리한 화합물의 세포 내 항산화 활성을 나타낸다. (a) Cu^{2+} -유도 산화 스트레스, (b) H_2O_2 -유도 산화 스트레스

도 3은 와송 추출물의 에틸아세테이트 분획물에서 분리한 화합물의 TRAP 활성을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 이하 실시예를 바탕으로 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명에 사용된 용어, 실시예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고 통상의 기술자의 이해를 돕기 위하여 예시된 것에 불과할 뿐이며, 본 발명의 권리범위 등이 이에 한정되어 해석되어서는 안 된다.

[0049] 본 발명에 사용되는 기술 용어 및 과학 용어는 다른 정의가 없다면 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 나타낸다.

[0050]

[0051] 본 발명은 (a) 와송을 메탄올로 가열 추출하고 감압 농축하여 추출물을 수득하는 단계; (b) 상기 추출물을 물에 현탁 시킨 후 노르말헥산, 클로로포름 및 에틸아세테이트 순으로 분획하여 노르말헥산 분획물, 클로로포름 분획물 및 에틸아세테이트 분획물을 수득하는 단계; 및 (c) 상기 에틸아세테이트 분획물을 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 화학식 1 내지 13의 화합물을 분리하는 단계를 포함하는 와송으로부터 골다공증 예방 또는 치료용 화합물을 분리하는 방법에 관한 것이다.

[0052] 상기 메탄올은 95% 메탄올이 사용되는 것이 바람직하다.

[0053] 가열 추출은 와송 100중량부에 대하여 메탄올 500~3,000중량부를 가하고 40~90℃에서 1~12시간 가열하여 추출할 수 있으며, 95% 메탄올로 1~3시간씩 1~5번 반복해서 가열 추출하는 것이 바람직하다.

[0054] 가열 추출한 후 감압 농축하여 용매를 모두 제거한 다음 와송 추출물을 수득한다.

[0055] 상기 추출물을 물에 현탁 시킨 후 노르말헥산, 클로로포름 및 에틸아세테이트 순으로 분획하여 노르말헥산 분획물, 클로로포름 분획물 및 에틸아세테이트 분획물을 수득할 수 있다.

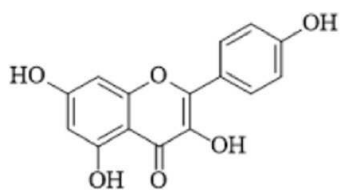
[0056] 예를 들어, 상기 추출물을 물에 현탁 시킨 후 노르말헥산으로 3회 용매분획하여 노르말헥산 분획물을 수득하고, 남은 수층을 클로로포름으로 3회 용매분획하여 클로로포름 분획물을 수득하며, 남은 수층을 에틸아세테이트로 용매분획하여 에틸아세테이트 분획물을 수득할 수 있다.

[0057] 상기 에틸아세테이트 분획물을 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 화학식 1 내지 13의 화합물을 분리한다.

[0058] 분리한 화합물은 ^1H NMR, ^{13}C NMR 등의 핵자기공명분석(NMR), 융점, 적외선 분광분석(IR) 등을 이용하여 분자구조를 결정하였다.

[0060] [화학식 1]

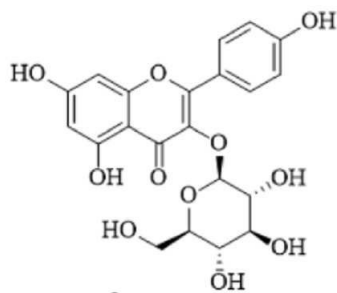
[화학식 2]



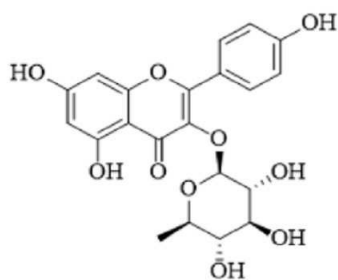
[0061]

[0063]

[화학식 3]



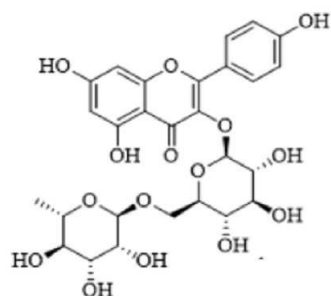
[화학식 4]



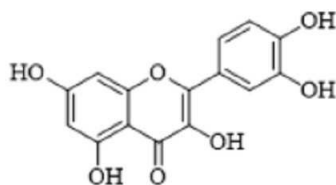
[0064]

[0066]

[화학식 5]



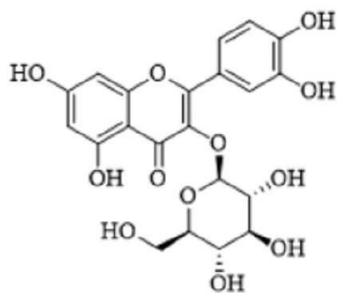
[화학식 6]



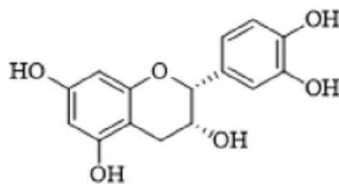
[0067]

[0068]

[화학식 7]



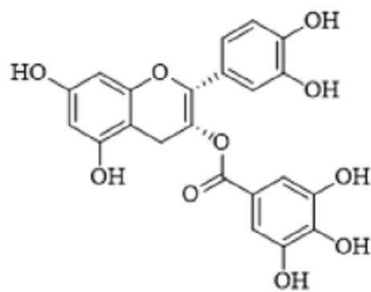
[화학식 8]



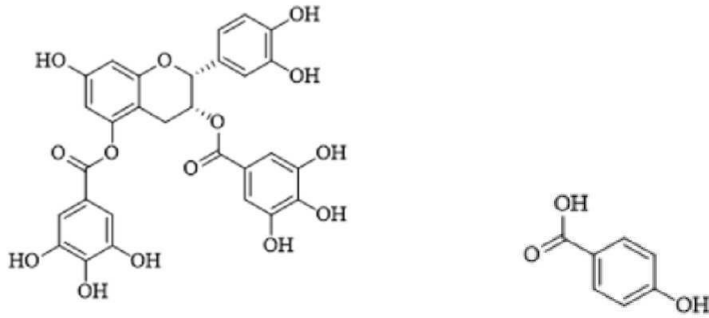
[0069]

[0071]

[화학식 9]



[화학식 10]

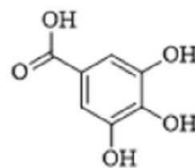
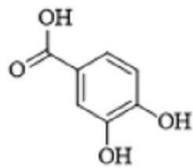


[0072]

[0074]

[화학식 11]

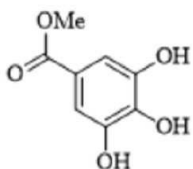
[화학식 12]



[0075]

[0077]

[화학식 13]



[0078]

[0080]

또한 본 발명은 와송 추출물; 그의 분획물; 화학식 1 내지 13의 화합물 중 하나 이상의 화합물; 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 유효성분으로 포함하는 골다공증 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0081]

본 발명의 와송 추출물, 그의 분획물 및 화학식 1 내지 13의 화합물 중 하나 이상의 화합물은 골다공증의 예방 또는 치료를 위하여 사용될 수 있다.

[0082]

와송 추출물, 그의 분획물 및 화학식 1 내지 13의 화합물은 높은 peroxy radical 소거 활성 및 reducing capacity를 나타내고, 세포 내 산화 스트레스를 효과적으로 감소시켜 우수한 세포 내 항산화 활성을 나타내며, 높은 파골세포 분화 억제 활성을 가지므로 골다공증의 예방에 효과가 있다.

[0083]

상기 와송 추출물은 와송을 메탄올로 가열 추출하고 감압 농축하여 수득한다.

[0084]

상기 메탄올은 95% 메탄올이 사용되는 것이 바람직하다.

[0085]

가열 추출은 와송 100중량부에 대하여 메탄올 500~3,000중량부를 가하고 40~90℃에서 1~12시간 가열하여 추출할 수 있으며, 95% 메탄올로 1~3시간씩 1~5번 반복해서 가열 추출하는 것이 바람직하다.

[0086]

가열 추출한 후 감압 농축하여 용매를 모두 제거한 다음 와송 추출물을 수득한다.

[0087]

상기 분획물은 상기 와송 추출물을 물에 현탁시킨 후 노르말헥산, 클로로포름 및 에틸아세테이트 순으로 분획하여 노르말헥산 분획물, 클로로포름 분획물 및 에틸아세테이트 분획물을 수득할 수 있으며, 에틸아세테이트 분획물인 것이 바람직하다.

[0088]

상기 에틸아세테이트 분획물을 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 화학식 1 내지 13의 화합물을 분리한다.

[0089]

본 발명의 약학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

- [0090] 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0091] 본 발명의 약학 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0092] 본 발명은 와송 추출물; 그의 분획물; 화학식 1 내지 13의 화합물 중 하나 이상의 화합물; 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 유효성분으로 포함하는 골다공증 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.
- [0093] 식품은 각종 식품류, 캔디, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등의 형태일 수 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 음료 등의 형태로 제공될 수 있다.
- [0094] 본 발명은 와송을 메탄올로 가열 추출하고 감압 농축하여 제조되는 골다공증 예방 또는 개선용 와송 추출물에 관한 것이다.
- [0095] 상기 와송 추출물은 화학식 1 내지 13의 화합물을 포함하는 것을 특징으로 하며, 골다공증의 예방 또는 개선에 효과가 있다.
- [0097] 이하 실시예를 통해 본 발명을 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명의 실시를 위하여 예시된 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.
- [0099] (실시예 1) 와송 추출물 제조
- [0100] 와송은 충남 금산의 건재상에서 구입하였다. 이는 전문가의 감정을 받았으며, 표본(CNU-14111)은 충남 대학교 약학대학에 보관하였다.
- [0101] 건조된 와송 2kg을 95% 메탄올로 50℃에서 3회 환류 추출한 다음 감압 농축하고 용매를 모두 제거하여 추출물 300g를 수득하였다.
- [0103] (실시예 2) 와송 추출물의 에틸아세테이트 분획물 제조
- [0104] 상기 와송 추출물 300g를 3L의 물에 현탁 시킨 후, 노르말헥산, 클로로포름 및 에틸아세테이트 순으로 분획하여 노르말헥산 분획물(H), 클로로포름 분획물(C) 및 에틸아세테이트 분획물(E)을 수득하였다.
- [0106] (실시예 3) 화학식 1 내지 13의 화합물 분리
- [0107] 와송의 에틸아세테이트 분획물(E)을 클로로포름과 메탄올을 이동상(100:1 → 0.5:1, stepwise)으로 하여 10개의 분획물을 얻었다(E1-10).
- [0108] 분획물 E5는 메탄올과 물(0:1 → 2:1)을 이동상으로 하여 C-18 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 7개의 분획물(E51-57)과 화합물 3(30mg)을 얻었다.
- [0109] 분획물 E53은 클로로포름과 메탄올(1:0 → 1:1)을 이동상으로 하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 4개의 분획물(E531-534) 및 화합물 13(25mg)과 11(5mg)을 수득하였다.
- [0110] 분획물 E532는 55%의 메탄올을 이동상으로 하여 C-18 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 화합물 9(17mg)과 12(56mg)을 분리하였다.
- [0111] 분획물 E534 역시 55%의 메탄올을 이동상으로 하여 C-18 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 화합물 2(135mg)를 분리하였다.
- [0112] 분획물 E55는 60%의 메탄올을 이동상으로 하여 C-18 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 화합물 1(21mg)을 분리하였다.
- [0113] 분획물 E7은 메탄올과 물(0:1 → 2:1)을 이동상으로 하여 C-18 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 5개의 분획물(E71-75)과 화합물 6(102mg)과 7(14mg)을 얻었다.
- [0114] 분획물 E72는 메탄올과 물(0:1 → 2:1)을 이동상으로 하여 C-18 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 화합물 10(8mg)과 8(63mg)을 얻었다.

- [0115] 분획물 E74는 클로로포름과 메탄올(1:0 → 1:1)을 이동상으로 하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 분획물(E741-742)와 화합물 4(21mg)를 분리하였다.
- [0116] 분획물 E742는 메탄올과 물(0:1 → 2:1)을 이동상으로 하여 C-18 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 화합물 5(73mg)를 얻었다.
- [0118] (실시예 4) 화학식 1 내지 13의 화합물 확인
- [0119] 분리한 화합물은 ^1H NMR, ^{13}C NMR 등의 핵자기공명분석(NMR), 융점, 적외선 분광분석(IR) 등을 이용하여 분자구조를 결정하였다.
- [0121] 캄페롤 (Kaempferol, 화학식 1의 화합물)
- [0122] 상성 : 노란색 파우더 (Yellow powder)
- [0123] m/z : 286
- [0124] 분자식 : $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$
- [0125] ^1H -NMR (MeOH- d_4 , 300 MHz) δ 8.88 (1H, d, J=8.2 Hz), 6.89 (1H, d, J=8.2 Hz), 6.88 (1H, d, J=1.4 Hz), 6.17 (1H, d, J=1.4 Hz).
- [0126] Ref. Soliman, F.M.; Shehata, A. H.; Khaleel, A. E.; Ezzat, S. M. An Acylated Kaempferol Glycoside from Flowers of *Foeniculum vulgare* and *F. Dulce*. (2002), 7, 245-251.
- [0128] 캄페롤 3-O-글루코사이드 (Kaempferol-3-O-glucoside, 화학식 2의 화합물)
- [0129] 상성 : 노란색 파우더 (Yellow powder)
- [0130] m/z : 448
- [0131] 분자식 : $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$
- [0132] ^1H -NMR (MeOH- d_4 , 300 MHz) δ 8.07 (1H, d, J=8.2 Hz), 6.90 (1H, d, J=8.0 Hz) 6.41 (1H, s), 6.21 (1H, s), 5.26 (1H, d, J=5.7 Hz), 3.73-3.23 (6H, m)
- [0133] ^{13}C -NMR (MeOH- d_4 , 75 MHz) δ 195.1, 177.97, 164.59, 161.6, 160.1, 157.6, 157.1, 134.0, 130.8, 121.3, 114.6, 104.3, 102.6, 98.4, 93.3, 77.0, 76.6, 74.3, 69.9, 61.2.
- [0134] Ref. Kim, H. J.; Lee, J. Y.; Kim, S. M.; Park, D.-A.; Jin, C. B.; Hong, S. P.; Lee, Y. S. A new epicatechin gallate and calpain inhibitory activity from *Orostachys japonicus*. (2009), 80, 73-76.
- [0136] 캄페롤-3-O-람노피라노사이드 (Kaempferol-3-O-rhamnopyranoside, 화학식 3의 화합물)
- [0137] 상성 : 노란색 파우더 (Yellow powder)
- [0138] m/z : 432
- [0139] 분자식 : $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$
- [0140] ^1H -NMR (MeOH- d_4 , 300 MHz) δ 7.76 (1H, d, J = 8.6 Hz), 6.94 (1H, d, J = 8.6 Hz), 6.36 (1H, d, J = 1.6 Hz), 6.19 (1H, d, J = 1.6 Hz), 5.39 (1H, d, J = 1.1 Hz), 5.39 (1H, d, J = 1.1 Hz), 4.25 (1H, .m), 3.73 (1H, m), 3.36 (2H, M), (3H, d, J = 5.0 Hz).
- [0141] ^{13}C -NMR (MeOH- d_4 , 75 MHz) δ 178.1, 164.4, 161.7, 160.1, 157.8, 157.1, 134.8, 130.5, 121.2, 115.1, 104.5, 102.0, 98.4, 93.3, 71.8, 70.7, 70.6, 70.5, 16.2.
- [0142] Ref. Kim, H. J.; Lee, J. Y.; Kim, S. M.; Park, D.-A.; Jin, C. B.; Hong, S. P.; Lee, Y. S. A new epicatechin gallate and calpain inhibitory activity from *Orostachys japonicus*. (2009), 80, 73-76.

- [0144] 캄페롤-3-*O*-루티노사이드 (Kaempferol-3-*O*-rutinoside, 화학식 4의 화합물)
- [0145] 상성 : 노란색 파우더 (Yellow powder)
- [0146] m/z : 594
- [0147] 분자식 : $C_{27}H_{30}O_{15}$
- [0148] $^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4 , 300 MHz) δ 8.11 (2H, d, $J = 8.9$ Hz), 6.90 (2H, d, $J = 8.9$ Hz), 6.42 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 6.23 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 5.06 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 4.53 (1H, s), 3.80-3.35 (11H, m), 1.20 (1H, d, $J = 6.1$ Hz).
- [0149] Ref. Sousa, E. A. d.; Silva, A. A. C. A. d., Cavaleiro, A. J.; Lago, J. H. G.; Chaves, M. H. A New Flavonoid Derivative from Leaves of *Oxandra sessiliflora* R. E. Fries. (2014), 25 (4), 704-708.
- [0151] 퀘서틴 (Quercetin, 화학식 5의 화합물)
- [0152] 상성 : 노란색 파우더 (Yellow powder)
- [0153] m/z : 302
- [0154] 분자식 : $C_{15}H_{10}O_7$
- [0155] $^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4 , 300 MHz) δ 7.64 (1H, d, $J = 1.9$ Hz), 7.54 (1H, dd, $J = 8.5, 1.9$ Hz), 6.78 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.29 (1H, d, $J = 1.9$ Hz), 6.09 (1H, d, $J = 1.9$ Hz).
- [0156] Ref. Soliman, F.M.; Shehata, A. H.; Khaleel, A. E.; Ezzat, S. M. An Acylated Kaempferol Glycoside from Flowers of *Foeniculum vulgare* and *F. Dulce*. (2002), 7, 245-251.
- [0158] 퀘서틴-3-*O*-글루코사이드 (Quercetin-3-*O*-glucoside, 화학식 6의 화합물)
- [0159] 상성 : 노란색 파우더 (Yellow powder)
- [0160] m/z : 464
- [0161] 분자식 : $C_{21}H_{20}O_{12}$
- [0162] $^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4 , 300 MHz) δ 7.72 (1H, d, $J = 1.7$ Hz), 7.60 (1H, dd, $J = 8.4, 1.7$ Hz), 6.88 (1H, d, $J = 1.7$ Hz), 6.40 (1H, d, $J = 1.4$ Hz), 6.21 (1H, d, $J = 1.5$ Hz), 5.27 (1H, d, $J = 7.2$ Hz).
- [0163] Ref. Kim, H. J.; Lee, J. Y.; Kim, S. M.; Park, D.-A.; Jin, C. B.; Hong, S. P.; Lee, Y. S. A new epicatechin gallate and calpain inhibitory activity from *Orostachys japonicus*. (2009), 80, 73-76.
- [0165] (-)에피카테킨 ((-)epicatechin, 화학식 7의 화합물)
- [0166] 상성 : 노란색 파우더 (Yellow powder)
- [0167] m/z : 290
- [0168] 분자식 : $C_{15}H_{14}O_6$
- [0169] $^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4 , 300 MHz) δ 6.87 (1H, d, $J = 1.1$ Hz), 6.70 (1H, dd, $J = 8.2, 1.5$ Hz), 6.66 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), 5.84 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 5.82 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 4.7 (1H, s), 4.0 (1H, t, $J = 2.8$ Hz), 2.76 (1H, dd, $J = 16.7, 4.5$ Hz), 2.63 (1H, dd, $J = 16.7, 2.8$ Hz).
- [0170] Ref. Thanh, N. V.; Thao, N. P.; Huong, P. T. T.; Lee, S. H.; Jang, H. D.; Cuong, N. X.; Nama, N. H.; Kiema, P. V.; Kim, Y. H.; Minh, C. V. Naphthoquinone and avonoid constituents from the carnivorous plant *Nepenthes mirabilis* and their anti-osteoporotic and antioxidant activities. (2015), 11, 254-259.
- [0172] (-)에피카테킨-3-*O*-갈레이트 ((-)epicatechin-3-*O*-gallate, 화학식 8의 화합물)

- [0173] 상성 : 노란색 파우더 (Yellow powder)
- [0174] m/z : 290
- [0175] 분자식 : $C_{15}H_{14}O_6$
- [0176] 1H -NMR (MeOH- d_4 , 300 MHz) δ 6.86 (2H, s), 6.85 (1H, d, J = 1.8 Hz), 6.71 (1H, dd, J = 8.2, 1.8 Hz), 6.61 (1H, d, J = 8.2 Hz), 5.88 (1H, s), 5.88 (1H, s), 5.4 (1H, s), 4.9 (1H, s), 2.90 (1H, dd, J = 17.3, 4.5 Hz), 2.63 (1H, dd, J = 17.3, 1.7 Hz).
- [0177] ^{13}C -NMR (MeOH- d_4 , 75 MHz) δ 166.3, 156.4, 156.3, 144.9, 144.5, 144.5, 138.4, 130.1, 120.1, 118.1, 114.7, 113.7, 108.9, 108.9, 95.2, 94.6, 77.2, 68.8, 25.5.
- [0178] Ref. Thanh, N. V.; Thao, N. P.; Huong, P. T. T.; Lee, S. H.; Jang, H. D.; Cuong, N. X.; Nama, N. H.; Kiema, P. V.; Kim, Y. H.; Minh, C. V. Naphthoquinone and avonoid constituents from the carnivorous plant *Nepenthes mirabilis* and their anti-osteoporotic and antioxidant activities. (2015), 11, 254-259.
- [0180] (-)에피카테킨-3,5-O-갈레이트 ((-)-epicatechin-3,5-O-gallate, 화학식 9의 화합물)
- [0181] 상성 : 노란색 파우더 (Yellow powder)
- [0182] m/z : 594
- [0183] 분자식 : $C_{29}H_{22}O_{14}$
- [0184] 1H -NMR (MeOH- d_4 , 300 MHz) δ 7.33 (2H, s), 6.79 (2H, s), 6.94 (1H, d, J=1.8 Hz), 6.85 (1H, d, J=8.2, 1.8 Hz), 6.51 (1H, d, J= 8.2 Hz), 6.41 (1H, d, J=8.2 Hz), 5.64 (1H, s), 5.24 (1H, s), 3.16 (1H, dd, J=17.3, 4.5 Hz), 2.82 (1H, dd, J= 17.3, 1.7 Hz).
- [0185] ^{13}C -NMR (MeOH- d_4 , 75 MHz) δ 166.1, 165.1, 156.7, 155.9, 150.6, 145.3, 144.9, 144.6, 139.2, 138.5, 129.6, 199.8, 188.8, 118.0, 114.6, 113.7, 109.2, 108.8, 103.5, 102.4, 100.6, 77.4, 67.9, 25.7.
- [0186] Ref. Hashimoto, F.; Nonaka, G.-I.; Nishioka, I. Chem. Pharm. Bull. (1989), 37, 77-85.
- [0188] 4-하이드로시벤조익산 (4-Hydroxybenzoic acid, 화학식 10의 화합물)
- [0189] m/z : 138
- [0190] 분자식 : $C_7H_6O_3$
- [0191] 1H -NMR (MeOH- d_4 , 300 MHz) δ 6.83 (2H, d, J =7.8 Hz), 6.83 (2H, d, J = 7.8 Hz)
- [0192] Ref. Khadem, S.; Marles, R. J. Molecules. 2010, 15, 7985-8005
- [0194] 3,4-다이하이드로시벤조익산 또는 바닐릭산 (3,4-Dihydroxybenzoic acid or vanillic acid, 화학식 11의 화합물)
- [0195] m/z : 154
- [0196] 분자식 : $C_7H_6O_4$
- [0197] 1H -NMR (MeOH- d_4 , 300 MHz) δ 7.34 (1H, s), 7.32 (1H, overlapped m), 6.70 (1H, d, J=7.8 Hz)
- [0199] 갈릭산 (Gallic acid, 화학식 12의 화합물)
- [0200] m/z : 170
- [0201] 분자식 : $C_7H_6O_5$

- [0202] $^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4 , 300 MHz) δ 7.24 (2H, s)
- [0203] Ref. Erlund, I. Nutr. Res. 2004, (24), 77-85.
- [0205] 메틸 갈레이트 (Methyl gallate, 화학식 13의 화합물)
- [0206] m/z : 184
- [0207] 분자식 : $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_5$
- [0208] $^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4 , 300 MHz) δ 6.96 (2H, s), 3.71 (3H, s)
- [0209] $^{13}\text{C-NMR}$ (MeOH- d_4 , 75 MHz) δ 167.7, 145.0, 138.3, 120.0, 108.7, 50.9.
- [0210] Ref. Erlund, I. Nutr. Res. 2004, (24), 77-85.
- [0212] (실시예 5) 와송 추출물의 에틸아세테이트 분획물에서 분리한 화합물의 peroxy radical 소거 활성 및 reducing capacity
- [0213] Peroxyl radical 소거활성은 Kurihara 등의 방법을 변형한 ORAC 분석법을 이용하였다.
- [0214] ORAC 분석법은 차, 과일, 동물의 조직 및 혈액등과 같은 다양한 식품 및 생물소재들의 항산화 활성 분석에 널리 이용되고 있다.
- [0215] 분석에는 형광의 간섭을 최소화하기 위하여 96-well micro plate (black, flat bottom)를 사용하였다.
- [0216] 75mM potassium phosphate buffer (PBS, pH 7.4)에 녹인 100 μL 의 40nM fluorescein을 plate에 넣은 후, 5mM PBS (pH 7.4)에 희석한 각각의 농도별 샘플 50 μL 를 투입하였다.
- [0217] 그 후 75mM PBS (pH 7.4)에 녹인 50 μL 의 20mM AAPH를 plate에 첨가하였다.
- [0218] 수용성 비타민 E 유도체인 Trolox와 AAPH는 분석시마다 새로 만들어 사용하였다.
- [0219] 측정은 SpectraMax[®] (Molecular Devices, Austria)를 사용하며, 형광 분석기는 측정 전 10초간 shaking한 후 5초 동안 안정화 하도록 설정하였다.
- [0220] 96-well micro plate는 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2분 간격으로 총 200분 동안 형광을 측정하도록 설정하였다.
- [0221] Fluorescein은 excitation wavelength 485nm, emission wavelength 535nm에서 측정하였다.
- [0222] 최종 결과는 측정시료의 형광값과 blank의 형광값 간의 넓이 차이로 계산하며 standard curve는 1, 5 및 10 μM 의 수용성 vitamin E 유도체인 Trolox를 이용하여 측정하고, 모든 결과는 TE (Trolox equivalents, μM)로 환산하여 표기하였다.
- [0224] Reducing capacity는 Arouma 등의 방법 (Arouma I O et al. J. Agric. Food Chem. 1998)을 이용하여 분석하였다.
- [0225] 10mM PBS (pH 7.4)에 용해시킨 100 μM CuCl_2 용액 20 μL 와 동일한 buffer에 용해시킨 250 μM neocuproine 용액 80 μL 를 혼합한 다음 측정시료 40 μL 를 첨가하고 실온에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 반응액 200 μL 를 96-well micro plate로 옮겨 454nm에서 ELISA reader를 이용해 흡광도를 측정하였다.
- [0226] Sample blank로 CuCl_2 용액 대신에 10mM PBS를 사용하며, 시료의 reducing capacity는 Cu^{1+} /neocuproine의 extinction coefficient ($7.95 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)를 사용하여 흡광도로부터 계산된 Cu^{1+} 의 농도로서 표시하였다.
- [0228] 와송 추출물의 에틸아세테이트 분획물에서 분리한 화합물의 *in vitro*에서 ORAC assay 및 reducing capacity 분석을 통해 항산화 활성을 측정한 결과는 도 1에 제시된다.
- [0229] 화학식 1의 화합물은 A3, 화학식 2의 화합물은 11-1, 화학식 3의 화합물은 11-16, 화학식 4의 화합물은 1-8, 화학식 5의 화합물은 D-8, 화학식 6의 화합물은 11-2, 화학식 7의 화합물은 B40, 화학식 8의 화합물은 B2, 화학식 9의 화합물은 A5, 화학식 10의 화합물은 B31, 화학식 11의 화합물은 D-3, 화학식 12의 화합물은 H7 및

화학식 13의 화합물은 D1을 나타낸다.

- [0231] 1, 5 μ M 농도에서 peroxy radical 소거 활성을 측정한 결과, 화합물의 peroxy radical-scavenging activity는 농도 1 μ M에서 A3 (3.41 ± 0.2), 11-1 (3.18 ± 0.16), 11-16 (1.93 ± 0.08), 1-8 (4.47 ± 0.22), D-8 (2.07 ± 0.15), 11-2 (3.92 ± 0.15), B40 (3.70 ± 0.24), B2 (3.31 ± 0.05), A5 (1.71 ± 0.12), B31 (0.97 ± 0.05), D-3 (1.46 ± 0.15), H7 (1.03 ± 0.13), D1 (1.38 ± 0.26) 이었다.
- [0232] 농도 5 μ M 에서 A3 (5.29 ± 0.06), 11-1 (11.12 ± 0.24), 11-16 (7.68 ± 0.25), 1-8 (14.78 ± 0.44), D-8 (4.92 ± 0.28), 11-2 (10.36 ± 0.39), B40 (8.89 ± 0.24), B2 (11.00 ± 0.07), A5 (13.68 ± 0.24), B31 (4.19 ± 0.46), D-3 (3.29 ± 0.18), H7 (4.11 ± 0.11), D1 (3.98 ± 0.23)로 나타났다.
- [0233] Reducing capacity는 농도 1 μ M에서 A3 (1.22 ± 0.13), 11-1 (0.50 ± 0.00), 11-16 (0.67 ± 0.06), 1-8 (0.96 ± 0.06), D-8 (1.76 ± 0.11), 11-2 (3.35 ± 0.13), B40 (0.88 ± 0.11), B2 (5.12 ± 0.17), A5 (5.83 ± 0.06), B31 (-0.04 ± 0.06), D-3 (1.76 ± 0.11), H7 (1.80 ± 0.13), D1 (2.31 ± 0.06) 이었다.
- [0234] 농도 5 μ M 에서 A3 (2.73 ± 0.13), 11-1 (3.02 ± 0.00), 11-16 (1.68 ± 0.06), 1-8 (2.68 ± 0.06), D-8 (5.66 ± 0.11), 11-2 (15.47 ± 0.30), B40 (11.32 ± 0.30), B2 (24.36 ± 0.06), A5 (28.55 ± 0.23), B31 (0.13 ± 0.11), D-3 (3.06 ± 0.11), H7 (8.68 ± 0.11), D1 (11.78 ± 0.17)로 나타났다.
- [0235] 와송 추출물의 에틸아세테이트 분획물에서 분리한 화합물 중 11-2, B40, B2, A5가 가장 높은 peroxy radical 소거 활성 및 reducing capacity를 나타내었으며, 이러한 결과는 상기 화합물이 hydrogen과 electron 을 peroxy radical에 공여함으로써 peroxy radical을 소거하는 항산화 활성을 가지기 때문이다.
- [0237] (실시예 6) 와송 추출물의 에틸아세테이트 분획물에서 분리한 화합물의 세포 내 항산화 활성
- [0238] HepG2 세포를 96-well plate에 5×10^5 cells/well의 수로 배양하여 24시간 예비 배양하고 test sample 을 30분간 처리하였다.
- [0239] Media를 제거한 후 각 well에 50 μ L의 Hank's balanced salt solution (HBSS)로 1회 씻어준다.
- [0240] Media 대신 각 well에 형광의 간섭을 받지 않는 200 μ L의 HBSS으로 교체해 주고 60 μ M의 AAPH 또는 1mM의 H₂O₂를 가한 다음 30분간 배양한 후 40 μ M의 DCFH-DA를 가하여 30분간 추가로 배양하였다.
- [0241] 측정은 SpectraMax[®] (Molecular Devices, Austria)를 이용하여 Excitation wavelength 485nm, emission wavelength 535nm에서 형광을 측정하였다.
- [0243] 와송 추출물의 에틸아세테이트 분획물에서 분리한 화합물의 Cu²⁺ 또는 H₂O₂로 산화스트레스를 유도한 HepG2 세포를 이용한 세포 내 항산화 활성을 분석한 결과는 도 2에 제시되어 있다.
- [0244] Cu²⁺에 의해 유도된 산화스트레스는 시료를 처리하지 않은 TC(treat control)에서 482.41 ± 16.47 수준이며 농도 5 μ M 에서 A3 (568.90 ± 31.02), 11-1 (493.80 ± 32.76), 11-16 (495.23 ± 21.51), 1-8 (449.36 ± 7.31), D-8 (373.81 ± 16.73), 11-2 (302.85 ± 13.48), B40 (331.06 ± 23.69), B2 (256.09 ± 17.02), A5 (309.00 ± 15.05), B31 (386.16 ± 18.88), D-3 (378.58 ± 4.79), H7 (461.20 ± 20.48), D1 (449.02 ± 5.99) 수준으로 나타났다.
- [0245] H₂O₂에 의해 유도된 산화스트레스는 시료를 처리하지 않은 TC(treat control)에서 245.22 ± 26.81 수준이며 농도 5 μ M 에서 A3 (189.41 ± 16.65), 11-1 (246.58 ± 19.07), 11-16 (314.68 ± 24.47), 1-8 (243.82 ± 10.12), D-8 (153.91 ± 9.93), 11-2 (229.66 ± 15.54), B40 (219.45 ± 4.76), B2 (165.35 ± 19.04), A5 (115.53 ± 2.07), B31 (221.82 ± 9.27), D-3 (218.97 ± 13.10), H7 (224.68 ± 19.49), D1 (145.17 ± 7.42) 수준으로 나타났다.
- [0246] 와송 추출물의 에틸아세테이트 분획물에서 분리한 화합물 중 11-2, B40, B2, A5에서 가장 효과적으로 산화스트레스를 감소시키는 것으로 나타났다.
- [0248] (실시예 7) 와송 추출물의 에틸아세테이트 분획물에서 분리한 화합물의 TRAP 활성
- [0249] TRAP 활성은 RAW 264.7 세포를 96-well plate에 1×10^4 cells/well의 수로 24시간 예비 배양하고, 분 화유도배지 [50 ng/mL receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)]와 함께 시료(UJW 8575)를

농도별로 처리하였다.

[0250] 매 2일마다 배지 교환 시에 시료를 넣고 총 5일간 배양하였다.

[0251] Media를 제거한 후 50 μ L의 PBS (pH 7.4)로 1회 세척 후 10 mM sodium tartrate와 5mM p-nitrophenylphosphate가 포함된 50 mM citrate buffer를 100 μ L씩 분주한 후 37°C에서 1시간 반응하였다.

[0252] 반응 후 0.1 N NaOH로 반응을 중지시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0254] 와송 추출물의 에틸아세테이트 분획물에서 분리한 화합물의 RAW 264.7 세포 주에서 파골세포 분화 유도 인자인 RANKL에 의해 5일간 분화시킨 후 파골세포 특이적으로 발현되는 Tartrate Resistant Acid Phosphatase (TRAP)의 활성을 측정한 결과는 도 3에 제시된다.

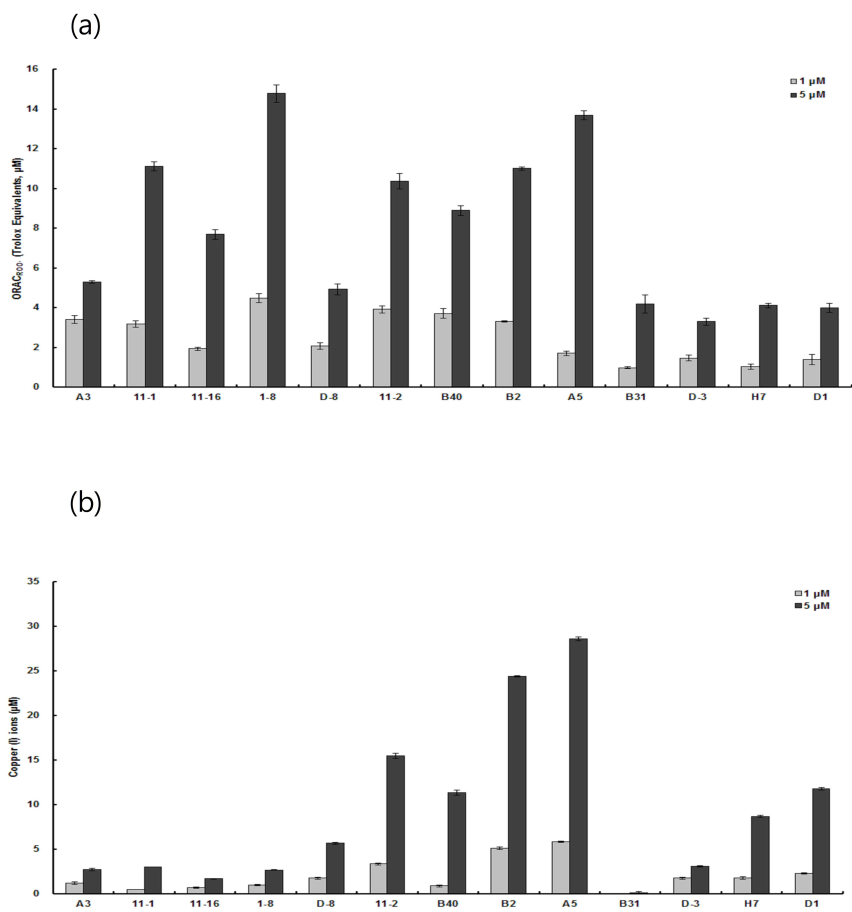
[0255] 시료를 처리하지 않은 TC(treat control)에서 TRAP activity는 216.78 ± 25.65 수준이며 5 μ M 농도에 서 A3 (183.02 ± 21.64), 11-1 (200.31 ± 9.30), 11-16 (189.58 ± 10.57), 1-8 (205.32 ± 19.93), D-8 (202.08 ± 8.98), 11-2 (200.08 ± 20.40), B40 (196.94 ± 10.99), B2 (176.39 ± 16.79), A5 (157.68 ± 5.68), B31 (203.23 ± 20.15), D-3 (209.85 ± 16.32), H7 (152.18 ± 15.53), D1 (211.26 ± 17.79) 수준으로 나타났다.

[0256] 와송 추출물의 에틸아세테이트 분획물에서 분리한 화합물 중 A5, H7에서 가장 효과적으로 RANKL에 의해 유도된 TRAP의 활성을 억제시키는 것으로 나타났다.

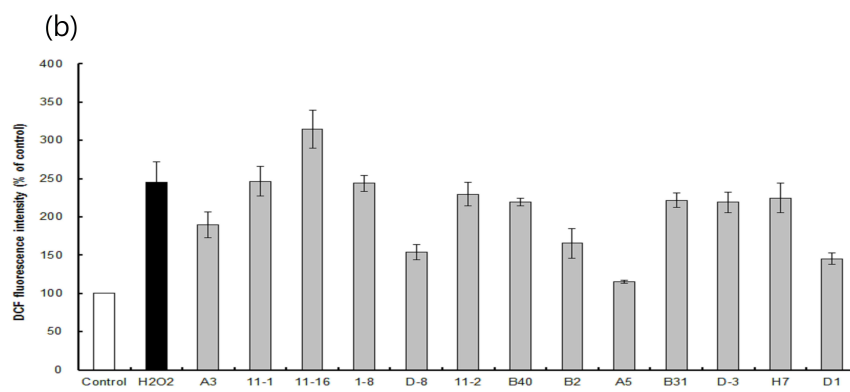
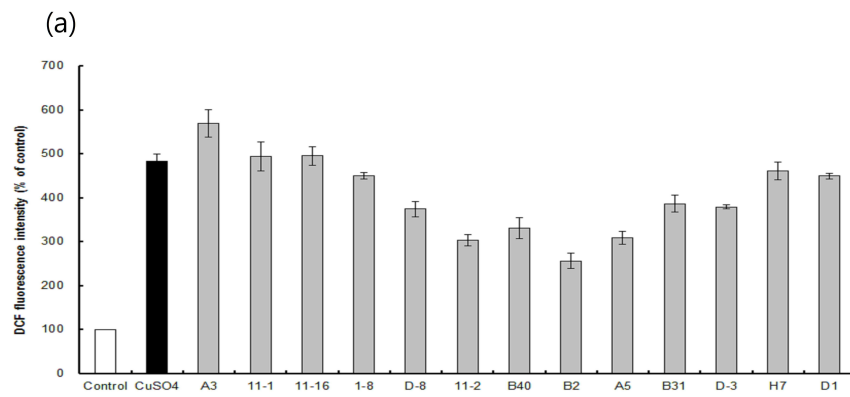
[0257] A5 화합물의 경우 세포 내 항산화 활성과 파골세포 분화 억제 활성을 동시에 가지며, A5 화합물의 항산화 활성은 RANKL에 의한 파골세포 분화 과정 중 발생하는 ROS를 조절함으로써 파골세포의 분화 억제에 기여하는 것으로 판단된다.

도면

도면1



도면2



도면3

